

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-103203
(43)Date of publication of application : 16.04.1990

(51)Int.CI. C08B 37/08
C12P 19/04
C12P 19/26

(21)Application number : 63-254985

(22)Date of filing : 12.10.1988

(71)Applicant : DENKI KAGAKU KOGYO KK

(72)Inventor : SAEGUSA HARUHISA
CHIBA SUSUMU
KITAGAWA HIROYUKI
MIYOSHI TERUZO

(54) PURIFICATION OF HYALURONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain in a stable manner high-quality hyaluronic acid useful in medicines by treating a hyaluronic acid-contg. solution with an aqueous solution of water-miscible organic solvent.

CONSTITUTION: A hyaluronic acid-contg. solution is treated with an aqueous solution (pref. 20-50wt.% in concentration) of a water-miscible organic solvent (e.g., methanol, ethanol, propanol, acetone).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報 (A)

平2-103203

⑤Int.Cl.⁵C 08 B 37/08
C 12 P 19/04
19/26

識別記号

府内整理番号

Z C 7330-4C
8214-4B
8214-4B

④公開 平成2年(1990)4月16日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

④発明の名称 ヒアルロン酸の精製法

②特 願 昭63-254985

②出 願 昭63(1988)10月12日

⑦発明者	三枝 治久	東京都町田市旭町3丁目5番1号	電気化学工業株式会社 中央研究所内
⑦発明者	千葉 晋	東京都町田市旭町3丁目5番1号	電気化学工業株式会社 中央研究所内
⑦発明者	北川 広進	東京都町田市旭町3丁目5番1号	電気化学工業株式会社 中央研究所内
⑦発明者	三好 照三	東京都町田市旭町3丁目5番1号	電気化学工業株式会社 中央研究所内
⑦出願人	電気化学工業株式会社	東京都千代田区有楽町1丁目4番1号	

明細書

1. 発明の名称

ヒアルロン酸の精製法

2. 特許請求の範囲

ヒアルロン酸含有液を水と混和する有機溶剤の水溶液で処理することを特徴とするヒアルロン酸の精製法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はヒアルロン酸含有液からヒアルロン酸を分離・精製する方法に関する。ヒアルロン酸は化粧品の保湿剤の他、眼科、整形外科、皮膚科等で医薬品としての用途が開かれてきている。

〔従来の技術と解決すべき課題〕

従来、ヒアルロン酸は、動物組織、例えば、工業規模では、ニワトリのトサカ等からの抽出法により製造されているが、夾雜物としてコンドロイチン硫酸が混入したり、組織内に含まれるヒアルロン酸などによって低分子量化されやすい、従つて高分子で高純度に精製されたものは、コス

ト高になる。

これら問題点を解決するため、近年酵解法によりヒアルロン酸を製造することが行なわれている。ヒアルロン酸がストレプトコッカス属のある群のバクテリアにより生産されることは、古くから知られ、多くの報告がある(ジェーピー、ウールコック(J.B. Woolcock)、ジャーナル・オブ・ジエネラルマイクロバイオロジー 85 372-375 1976)。

酵解法によつて製造されるヒアルロン酸は、抽出法に比べ、一定の原料で、一定の方法で製造されるため、製品の品質が一定に保たれることから、産業上の利用価値は大きい。

しかしながら、酵解液には、高分子化合物が不純物として存在し、それらを分離除去して高純度の製品を得る方法が検討されてきた。

例えば、本発明者らも先にアルミナを用いて発熱性物質、タンパク質等を除去するヒアルロン酸の精製法を提案した(特願昭63-144728号明細書)。

このアルミナを用いた方法も含め従来の精製処理方法は、いずれもヒアルロン酸を水溶液の状態で精製処理を行なう方法であつた。このような方法を用いた場合、原料の違い等により発熱性物質、タンパク質等が十分に除去されず、安定した除去効果が得られない場合が多く、実用上問題を残しております、医薬品として使用できる高品質な製品を再現性よく、安定して得る方法の開発が待たれていた。

本発明は簡便かつ高品質なヒアルロン酸を再現性よく分離・精製する方法を提供することを目的としている。

[課題を解決するための手段]

本発明は、精製処理を行なう際に、発熱物質、タンパク質、核酸、金属性等の不純物を効率よく、しかも再現性よく分離除去し、高純度、かつ精製過程で低分子化が起こりにくい精製方法について、鋭意検討した結果、ヒアルロン酸を、精製する際に、その一部又は全工程を水と混和する有機溶剤を用いて行なうことで、安定して発熱性物質等の

不純物を除去し、その目的が達せられる事を見出し、本発明を完成するに至つた。

すなわち本発明は、ヒアルロン酸含有液を水と混和する有機溶剤の水溶液で処理することを特徴とするヒアルロン酸の精製法である。

本発明で用いられる有機溶剤は、メタノール、エタノール、プロパノールといつたアルコール類、アセトンといつた水と混和する有機溶剤ならば特に種類を問わないが、グレードとしては試験グレードのものを使用することが好ましい。本発明は、有機溶剤をヒアルロン酸含有水溶液に加えたり、また、所定濃度の含水有機溶剤にヒアルロン酸を溶解して精製処理を行なうことを特徴とする。この時の加える有機溶剤の濃度は、ヒアルロン酸が析出しない程度の濃度までの広い濃度範囲で使用できる。

しかしながら、最も安定した効果を得るには20～50%程度の範囲が好ましい。

本発明で使用するヒアルロン酸含有液は動物組織から抽出したものでも、又醸酵法で製造したも

のでも使用することはできるが工業的に安価に、高品質な製品を安定に製造するためには醸酵法で製造したもののが望ましい。

醸酵法によるヒアルロン酸はストレプトコッカス属等のバクテリアを使用して既知の方法で得ることができる。醸酵法で使用する菌株は、自然界から分離されるストレプトコッカス属等のヒアルロン酸生産能を有する微生物、または、特開昭63-123392号公報に記載したストレプトコッカス・エキアム-100(微研菌寄第9027号)のような高収率で安定にヒアルロン酸を生産する変異株が好ましい。

そのようなヒアルロン酸生産能を有する微生物をグルコース、シュークロース等の炭素源、ペプトン、ポリペプトン、酵母エキス等の蛋白質源、ビタミン、無機塩等を用いた培地中で好気的に培養して得られる培養液をヒアルロン酸が0.1～5.9%の濃度になるように希釀後、既知の方法、例えば遠心分離による除菌、濾過による除菌、凝集剤による除菌、カーボン、セライト等による除菌な

どの方法で除菌した液を使用することが望ましい。

さらに望ましくは、透析処理による低分子化合物の除去、精密濃過処理による水不溶微粒子の除去、またヒアルロン酸含有液にアルコール、アセトン、ジオキサンなどの水溶性有機溶剤を添加してヒアルロン酸を析出分離後、再度0.1～5.9%の濃度にヒアルロン酸を溶解して使用することである。

本発明における精製処理方法としては、有機溶剤含有液を用いて行なう精製処理方法ならば何でも良く限定されることはないが、アルミナや活性炭、フロリジルを用いた処理方法では特に安定した効果が得られる。

ここで用いられるアルミナ、活性炭、フロリジルは、従来の精製処理法で用いられるもので、その種類、形状等は特に限定されることはない。また処理の方法としては、ヒアルロン酸含有液にこれらを粉状又は粒状で添加搅拌するバッチ式と充填塔等に粒状又は成型したものを充填後、ヒアルロン酸含有液を通液処理方法、またその組合せや

反復も可能であるが、バッチ式に比べて、充填塔方式の方が効果的である。またこの時の pH は 6 ~ 8 が望ましく、SV は 0.1 ~ 0.2 が最も効果的である。

〔実施例〕

次に本発明の実施例を示す。

参考例(プランク)

ストレプトコッカス・エクリアム-100(微生物検査第9027号)を用いて培養した培養液 15ℓを純水で 50ℓに希釈し(ヒアルロン酸濃度 1.10g/l)、遠心分離、ホローファイバー型限外ろ過を行ない、菌体と培地成分を除いた。

このヒアルロン酸含有液 500mlに食塩 15g を溶解、pH 7 に調節後、エタノール 750mlで析出、エタノール 100mlで洗浄を行い、40℃で真空乾燥し、0.49g のヒアルロン酸ナトリウムを得た。分析結果を表 1 に示した。

実施例 1

参考例で得られた粗精製ヒアルロン酸を 1.0g とり、水 700ml に溶解した後、エタノール 300

ml を加えて 0.1% ヒアルロン酸エタノール混合溶液とした。

一方、内径 1.1.3cm 高さ 15cm のカラムに、昭和電工社のアルミナ (A-^{1/3}-S) 300g を充填し、30% エタノールで充分洗浄した後、上記のヒアルロン酸エタノール混合溶液を SV = 0.2 (60ml/時) で通液した、カラム通過液を 500ml とり食塩 15g を加え、エタノール 750ml で析出・乾燥して、0.4g のヒアルロン酸ナトリウムを得た。分析結果を表 1 に示した。同一の操作を 10 回行なつたが、結果はすべて表 1 に示した値であつた。

比較例 1

実施例 1 で、エタノールを水にかえた以外は(但し、析出用エタノールは使用する)、同様の操作を行なつた。この操作を 10 回行ない分析結果の平均値を示した。

表 1

分析項目	参考例 (プランク)	実施例 1	比較例 1
タンパク質含量	0.65%	0.01%	0.10%
発熱性物質	3000 pg/mg	< 10 pg/mg	100 pg/mg
核酸	0.05%	検出せず	検出せず

比較例 1 では、実施例 1 と同等の品質のヒアルロン酸の得られる場合もあつたが、再現性がなく、平均すると表 1 に示す結果となつた。

実施例 2

実施例 1 でエタノールをアセトンにかえた以外は(但し、析出用エタノールは使用する)同様に行なつた。

表 2

分析項目	実施例 2	比較例*
タンパク質含量	0.01%	0.10%
発熱性物質	< 10 pg/mg	100 pg/mg
核酸	検出せず	検出せず

* 比較例 1 の値を示した。

実施例 3

参考例の粗精製ヒアルロン酸を 0.1g とり水 700ml に溶解した後、エタノール 30ml を加えて 0.1% ヒアルロン酸エタノール混合溶液とした。これに食塩 3g を加えた後、活性炭(和光社製、特級) 0.1g を加え 30℃ 1 hr 握拌した。その後、0.2μフィルター処理を行なつた後、1.5 倍量のエタノールを加えて析出させた。析出したヒアルロン酸の分析結果を表 3 に示した。同一の操作を 10 回行なつたが、結果はすべて表 3 に示した値であつた。

比較例 2

実施例 3 でエタノールを水にかえた以外は(但し析出用エタノールは使用する)同様の操作を行なつた。その結果の平均値を比較例 2 とした。

表 3

分析項目	実施例3	比較例2
タンパク質含量	0.02 %	0.25 %
発熱性物質	30 pg/mg	180 pg/mg
核 酸	検出せず	0.02 %

実施例4

参考例の粗精製ヒアルロン酸を0.2 gとり水140 mlに溶解した後、エタノール60 mlを加え、これに食塩を12 g溶解させた。この溶液を15 gの60-100メッシュのフロリジルを充填したカラム（直径1.5 cm）にて $V = 1$ で通液した。

この溶液に1.5倍量エタノールを加えて析出させ、析出したヒアルロン酸の分析結果を表4に示した。同一の操作を10回行なつたが結果はすべて表4に示した値であつた。

比較例3

実施例4でエタノールを水にえた以外は（但し、析出用エタノールは使用する）同様の操作を

10回行なつた。その結果の平均値を比較例3とした。

表 4

分析項目	実施例4	比較例3
タンパク質含量	0.03 %	0.32 %
発熱性物質	50 pg/mg	350 pg/mg
核 酸	検出せず	0.04 %

測定法

- 1) 蛋白質含量：精製ヒアルロン酸を、0.1 N 水酸化ナトリウムに溶解し、ローリー法にて行なつた。
- 2) 核 酸：0.1 %ヒアルロン酸ナトリウム溶液の260 nmにおける吸光度を測定した。
- 3) 発熱性物質：生化学工業社製トキシカラーシステムにより比色分析することにより行なつた。

〔発明の効果〕

本発明によれば、高品質なヒアルロン酸を安定して得ることができる。またこの方法で得られたヒアルロン酸は医薬方面の用途が期待される。

特許出願人 電気化学工業株式会社